

유류오염토양처리를 위한 미생물활성화방안 연구

최우진*, 김무훈**

(* 수원대학교 환경공학과, ** 삼성엔지니어링 기술연구소)

요 약 문

유류로 오염된 토양에 있어서의 미생물의 분포 및 활성도에 관한 연구는 오염토양의 생물학적 복원기술을 적용시키고자 하는 지역에서는 매우 중요한 연구이다. 따라서 본 연구에서는 유류 오염된 지역에서의 미생물 활성도를 ETS(Electron Transport System) 및 그 이외의 몇 가지 방법을 통하여 고찰해 보았다. 본 연구결과에 따르면 순화된 토양에서는 이미 유류를 산화시킬 수 있는 *Burkholderia spp.*가 이미 우점을 이루고 있었고, 생물학적 복원기술 중 Biostimulation법을 적용할 경우 이미 존재하는 미생물(Indigenous microorganism)에 의한 유류오염물질의 산화를 가속화시킬 수 있는 것으로 나타났다.

주제어: 유류오염토양, 미생물의 분포 및 활성도, 우점, 산화

서 론

1. 연구의 배경 및 목적

현대사회는 산업의 고도화, 복잡화로 많은 종류의 화학물질들이 생성, 소비, 배출됨으로서 각각의 오염물질에 대한 종합적이고 체계적인 통제 및 관리가 요구되고 있다. 환경내에서 이들 오염물질들은 물, 대기, 토양 등의 다양한 물질을 통하여 이동하면서 변화와 변형을 계속하면서 인간을 포함한 자연생태계에 영향을 미치고 있으며, 특히 토양을 매개체로 한 은 오염범위가 넓고 지하심층으로도 확산된다는 점에서 오염정화를 위한 처리가 상당히 어렵고 많은 비용과 장비를 필요로 한다. 우리 나라는 1960년대 이후부터 최근까지 경제개발에 치중하여 공업화를 이루어 산업의 발전은 이룰 수 있었으나 환경오염문제에 봉착하고 있는 것이 현실이다. 근래에

와서 수질, 대기 및 폐기물 등의 오염에 대해서는 신경을 쓰고 있으나 상대적으로 낮은 노출 속도와 사회적 관심 부족으로 인하여 토양 및 지하수의 오염과 처리는 무관심 속에 방치되어 왔다. 그러나 최근 들어 몇몇 지역의 오염 사실이 밝혀지면서 점차 토양오염에 대해 관심을 갖게 되었다. 토양은 여러 성상으로 불규칙하게 구성되어 있어 오염의 파악이 어렵고 한번 오염되어 그 기능을 잃어버리면 다시 복구하는데 오랜 시간과 많은 비용이 들어간다. 또한 각종 농산물을 통하여 토양에 축적된 오염물질이 인체로 유입되어 인체에 심각한 영향을 미치게 된다. 국내에선 1995년 지하수 보전법과 1996년 토양 환경보전법에 의해 지하수와 토양오염에 대한 규제방안이 마련됐으나 아직 조사 및 처리기술개발 등은 미미한 실정이다.

토양오염의 주요 오염원은 전국도처에 산재해 있는 불량폐기물 매립지에서 배출되는 침출수를 비롯한 오염물질, 공단지역에서 배출되는 오염원, 군부대에서 토양의 부적절한 관리로 인한 오염, 전국의 주유소에서 지하저장소의 누출로 인한 오염, 그리고 철로주변의 기름탱크의 누출과 중금속으로 인한 오염 등 오염원은 전국적으로 산재되어 있는 실정이다. 실제로 이러한 지역주변의 토양중에 있는 중금속과 독성 유기화합물질의 농도는 일반적으로 자연상태에 존재하는 농도보다 몇 백배 높은 것으로 조사되었다. 전세계적으로 산업의 발달과 인구의 증가 등의 이유로 인하여 현재의 지구는 온갖 오염에 시달리고 있다. 또한 전국의 토양 중금속오염 현황자료에 의하면 전국 260여개 지역 1,300개 지점을 골라 카드뮴, 납, 구리, 비소, 아연, 수은 등 6가지 중금속 함유량을 조사한 결과, 장항 제련소 인근의 장항읍 일대에서 비소(As)가 자연함유량의 33배인 18,571ppm이 검출되었다. 이러한 유류오염물질 및 중금속 유출로 인한 지하수와 토양의 심각한 오염에 대한 인식부족으로 이를 방치해 왔으나 1995년 토양환경보전법과 지하수 보전법을 제정하고 1996년부터 시행되고 있다. 그러나, 아직 국내 토양 현황 조사 및 처리, 정화기술의 확보가 미흡하여 이에 대한 연구가 시급한 실정이다. 토양환경보전법의 주요 내용은 토양 측정망을 설치 전국망과 지역망으로 구분하여 운영하고 있으며, Table 1.1에서 알 수 있듯이 현재 토양오염보전법상에서 규제되고 있는 항목은 중금속 6종(카드뮴, 납, 비소, 수은, 구리, 6가 크롬), 석유류, 유기인, PCB, 독성물질 2종(시안, 페놀) 총11항으로 구성되어 있다.¹⁴⁾ 토양 및 지하수의 사전예방을 위해 오염이 우려되는 지역에 대한 오염물질의 제거, 오염의 원인이 되는 시설이전, 기타 토양방지 시설설치 등의 의무화, 오염토양 처리기준 및 방법 설정, 사업주체 및 비용부담의 주체를 명문화하여 이에 따른 조사 및 그에 따른 복원이 강력히 요구되는 실정이다. 환경부는 토양오염유발 시설에 대한 오염도 조사를 의무화하여 지하/지상 저장탱크를 소유하고 있는 산업 시설, 저유소, 주유소에서의 오염도 조사를 일정한 주기별로 진행함에 따라 법적 기

준을 초과하는 지역에 대한 경제적이고 성능이 우수한 복원기술이 필요한 실정이다. 현재 국내의 기준은 BTEX를 기준으로 80mg/kg (TPH: 2000mg/kg)을 토양오염 우려기준으로, 200mg/kg (TPH: 5,000mg/kg)을 토양오염 대책기준으로 각각제시하고 있다.

Table 1.1 토양오염도 검사

토양오염유발시설	검사항목
1. 석유류의 제조 및 저장시설	유류(동물, 식물성 유류제외)
2. 유독물의 제조 및 저장시설	카드뮴, 구리, 비소, 수은, 납, 6가크롬, 유기인 화합물, 폴리크로리네이티드 비페닐, 시안 및 페놀 중 해당항목
3. 기타 위 유발시설과 유사한 시설로서 특별히 관리할 필요가 있다고 인정되어 환경부 장관이 관계중앙행정기관의 장과 협의하여 고시하는 시설	대상시설별로 관계중앙행정기관과 협의하여 고시한 검사항목

미국의 경우, 1978년 Love Canal사건(유해폐기물에 의한 환경오염의 상징으로 기억되는 사건)을 통해 1980년 CERCLA(Comprehensive Environmental Response, Compensation and Liability Act)가 제정되었고, 1988년 CERCLA보다 더욱 강화되어진 SARA(Superfund Amendments and Reauthorization Act)의 제정으로 토양 및 지하수 자원의 보호 등 강력한 오염 방지법을 통하여 오염지역의 복원을 위한 자금을 마련하고, SITE(Superfund Innovative Technology Evaluation)프로그램을 통하여 막대한 예산을 투입하여 오염토양 정화기술 개발에 노력한 결과 물리·화학적 정화기술인 Soil Vapor Extraction(SVE), Soil Washing/Flushing, Thermal treatment, Steam injection, Bioremediation, Bioventing 등의 상당한 발전을 이룩하였다. 또한 미국 환경처의 주관으로 미국 전역을 조사하여 약 1,300여개의 지역을 Superfund site로 지정하여 정부차원에서 관리하고 있다. 약 300,000개 이상의 오염지역이 잠재하고 있을 것으로 예상하고 있으며 현재 이러한 지역을 완전 복원하는데 평균 약 100억원이 소요되는데 향후 더욱 강화되어지는 환경기준치 때문에 약품 사용과 소요시간의 증가로 오염지역의 정화비용이 400억원까지 상승할 전망이다.

선진국의 경우, 70년대 말부터 오염토양정화 및 복원에 관심을 가지고 대대적인 조사와 아울러 정화기술에 대해 많은 연구가 진행되어 여러 가지 기술들이 개발되고 실용화되고 있다. 또한 토양오염 방지를 위하여 엄격한 법적 근거를 마련하여 시행하고 있으며, 그 내용을 보면 토지 소유자에게 오염에 대한 책임을 철저히 지게 하여 토양이 오염될 경우 이를 복원케 하거나 국가가 복원한 후 그 소요경비를 강제적으로 지불하게 하고 있다. 미국의 경우, 1976년에 RCRA, 1980년에는 CERCLA, 1986년에는 CERCLA의 수정법안인 SARA의 제정으로 토양 및 지하수자원의 보호 등 강력한 오염방지법을 통하여 오염지역의 복원을 위한 자금을 마련하였다. 또한, 미국 환경처의 SITE(Superfund Innovative Technology Evaluation) 프로그램을 통하여 막대한 예산을 투입하여 오염토양의 정화기술 개발에 노력한 결과 다양한 신기술들이 개발되어 실제 오염지역 복원에 적용되고 있다. 미국 전역에 잠재적으로 약 3만 여개의 Superfund 지역이 존재하고 있지만 오염정도, 주변의 환경영향 등을 고려하여 EPA주관으로 오염지역의 복원을 위한 우선 순위를 정하였다. 따라서, 약 1,200여개의 NPL(National Priority List)를 지정하여 1994년까지 200여 곳의 정화작업을 종료하고 2000년까지는 650여개의 지역을 처리 복원할 계획을 가지고 있다.

현재 국내에서 개발되어 사용되거나 개발 중인 기술을 보면 처리 위치에 따라 지상처리(Ex-situ)와 지중처리(In-situ)로 나눌 수 있는데, 지상처리(Ex-situ)는 오염토양을 외부로 파내어 지상에서 처리하는 방법으로 지하 오염물의 완전한 제거가 가능하고 오염물의 잔존확인이 용이하다는 이점이 있으나 토양 굴착에 따른 비용이 많이 들고 처리 후 다시 매립하여야 하는 단점이 있다. 이에 반해 지중처리(In-situ)는 처리비용이 저렴하다는 이점이 있으나 토양 내 상황을 정확히 파악하기 힘들고 토양의 특성에 많은 영향을 받는다는 단점이 있다. 이는 다시 처리 방법에 따라 토양세척, 진공추출, 차폐, 굴착제거 등의 물리적 방법과 산화, 중화, 계면활성제 첨가, 이온교환 등의 화학적 방법, 플라즈마, 열분해, 유리화 등의 열적 방법 및 미생물 등을 이용한 생물학적 방법 등이 있다. 오염토양 및 지하수 정화기술에 있어서 몇 가지 선택이 있는데 처리방법별로는 크게 in-situ 와 on-situ 또는 ex-situ 방법이 있으며 기술별로는 물리화학적 방법과 열적처리 방법 그리고 생물학적 방법으로 나눌 수 있다.¹⁾ 물리화학적 방법인 토양증기추출법(Soil Vapor Extraction; SVE)은 불포화층에서의 석유제품내 존재하는 휘발성물질을 제거하는 지중복원(In-situ remediation)기술이며, 생물학적 방법인 Bioventing은 휘발성이 비교적 낮은 물질인 디젤, 난방유, kerosene 같은 물질처리에 효과적이다.

2. 유류오염토양물질 및 토양의 물리/화학적 특성

2.1 토양오염 물질

유류로 생성된 오염지역을 복원하는데 긍정적인 측면은 유류 화합물질의 처리는 비교적 간단하다는 점이며, 대부분의 석유탄화수소는 지하수나 인체의 건강에 상대적으로 해롭지는 않다는 것이다(예: 벤젠이 음용수에 장기간 노출되면 인체 건강에 해로우나, 농약, 수은등의 경우보다는 경미함). 또한, 유류로 오염된 지역은 복원하기가 용이하고 대체로 처리비용도 적게 소요된다. 많은 유류 생성물질들은 토양에 존재하는 박테리아에 의해 소모되고, 밀도가 낮아 물에 뜬다. 반면에 유류로 형성된 오염지역을 복원하기 위한 가장 나쁜 소식은 가솔린은 환경의 도처에 편재해 있고, 휘발성이 강한 유류 오염물질은 화재 및 폭발의 위험을 초래할 수 있으며, 몇몇 석유화합물(특히, 가솔린)은 독성위험이 내재하고, 오염지역은 미생물에 유효하지 못한 깊은 지역까지 침투한다는 것이다.

1) 석유화합물 (Petroleum)

석유화합물은 수소와 탄소만으로 구성된 화합물이고, 고대 동식물의 퇴적으로부터 생성된 원유로부터 만들어졌다. 초기 퇴적물의 생화학물은 혐기성상태에서 점차적으로 비교적 순수한 석유탄화수소로 변화되었으며, 실질적으로 모든 석유 퇴적물은 다소의 황, 질소, 금속원소 등을 함유하고 있다. 석유 화합물의 형성은 수백만 년이 소요되고, 에너지(약 5200J/Kg)는 C-H결합의 형태로 저장되며, C-H결합이 깨지거나 새로운 H-O와 C=O결합이 만들어질 때 생성된다. 산화과정동안 O₂분자는 산소원자로 쪼개지고, C-H결합은 산소와 반응하여 깨진다. 탄화수소가 연소될 때 저장된 Energy는 기계에 동력을 공급하며, 석유화합물의 주요 용도로는 수송수단 및 산업용 연료, 난방, 운활유, 석유화학 제품 및 의약품 제조를 위한 생원료, 용제, 전기생산 등이고, 연료로서 사용되는 석유화합물의 약 65%는 자동차 가솔린으로 소모되어 환경오염을 유발시킨다. 석유 생성물질은 수백가지 화합물의 혼합용액으로 구성되어 있으며, 모든 석유연료는 주로 HC과 약간의 청정제, Alcohols, Amines과 같은 첨가제로 구성되어 있다. 연소는 주로 C 와 H를 CO₂ 와 H₂로 산화된다. 모든 화석연료는 약간의 황을 함유하고 있으며, S와 N는 고온에서 O₂와 반응하여 질소 및 황화합물을 형성하며, 도시지역 대기오염 및 산성비의 주요인이 되고 있다. Petroleum Products 누출 특히, 가솔린 오염의 경우는 여러 측면에서 공중건강을 위협하는데 휘발성물질(VOC)의 축적으로 화재 및 폭발의 위험이 있으며, 지하수, 지표수, 토양 등의 오염원이 된다.

① 가장 단순한 석유탄화수소

모든 HC은 H와 C결합의 배열로 구성되어 있으며, 적게는 하나에서 수백, 수천 개에 이르는 탄소 Chains의 화학결합을 형성하고 있다. 탄소는 항상 4개의 Bonds를 형성하고 있으며, 가장 단순한 HC는 Methane, Ethane, Propane이다. Chain 구조는 다양하며 구조에 따라 서로 다른 물리화학적 특성을 보유하고 있다.

② Aromatic Hydrocarbons

석유는 Aromatic HC라 불리는 불포화 HC를 함유하고 있고, 많은 경우는 특이한(불쾌하지 않은) 냄새를 가지고 있다. 대부분은 어느 정도 독성을 띄고 있으며, 기준이 되는 화합물은 Benzene(C_6H_6)이다. Benzene은 3개의 2중 bond를 가진 flat한 분자로 구성되어 있고, 방향족 화합의 고리는 매우 안정적이고 많은 반응물에 대하여 비활성을 띤다.

③ Alkyl Benzenes

Benzene ring은 Alkyl groups 혹은 염소(Cl)와 같은 원소들과 대체 가능한데, 이러한 물질들은 Benzen보다 유해하다. C_6H_5- 은 Phenyl이라 불리며, 잘 알려진 오염물질은 PCBs(Polychlorinated biphenyl)등을 들 수 있다. Gasoline 제조시 alkylbenzene은 연료의 octane가를 높이는데 사용하며, Benzene ring에 있는 H를 CH_3- 로 대체하면 Phenylmethane 혹은 Methylbenzene이라 불리는(실제로 Toluene) 화합물이 된다. Toluene은 원유 및 여러 가지 석유 생성물질에 함유되어 있으며, Benzene보다 독성이 약하며 용해도가 낮다. Benzene에 CH_3CH_2- (Ethyl 기)를 추가하면 ethylbenzene이 되며 Cumene, Mesitylene 및 다른 유사 Alkyl 방향족 화합물도 Gasoline에서 발견된다. Xylene은 gasoline연료와 여러 가지 Solvent(용제), 접착제등에 풍부하고, 이러한 4가지 종류의 화합물(BTEX)은 현재 국내외에서 오염을 판단할 수 있는 기준물질로 삼고 있다.

④ Polycyclic Aromatic Hydrocarbons(PAHs)

PAHs는 다중 Benzene rings을 함유한 방향족 화합물로서 Polycyclic aromatic 혹은 Polynuclear aromatic hydrocarbons(PNA_s)등으로 불린다. Diesel 연료는 PAHs를 함유하고 있으며, PAHs는 때로 "Coal tar"라 불려진다. PAHs는 낮은 용해도 때문에 미생물에 의해 잘 분해되지 않으며, 토양입자 특히 점토에 잘 흡착되어 처리나 복원이 용이하지 않다. 현재 국내에서는 PAHs가 규제물질로 사용되고 있지 않으나, 선진국에서는 오염규제 물질로 삼고 있다.

오염토양의 생물학적 처리법 (Bioremediation)

환경에 존재하는 유해한 유기물질은 이산화탄소나 메탄 같은 가스, 또는 물과 무기염, biomass 등 원래 오염물질보다 간단한 구조의 생물학적 부산물 (byproduct)로 분해된다. 생물학적 처리법은 유기, 무기 형태의 탄소가 산화와 환원을 통해 순환되는 탄소사이클의 한 부분이다. 토양의 생물학적 처리는 유기 폐기물의 퇴비화를 통해 토양 개량제로서 이용하던 것으로 거슬러 올라간다. 개량/향상된 토양의 생물학적 처리는 1940년대 석유화학산업이 정유폐기물을 land application하면서 시작되었다. 정부지원 연구과제와 일반 산업체/기업의 노력으로 유해물질의 처리기술, 토양 및 지하수 처리기술이 개발되었다. 이들 대부분의 기술들은 독점적인 기술도 아니고 특허로 보호받을 수 있을 만한 기술도 아니었고, 엔지니어링(공학) 측면에서의 적용 기술로 인식되었었다. (근래에 와서는 Exxon Valdez의 유류 유출에 대한 처리기술이 고유의 독자기술로 인정받기 시작했다.) 자연적인 토양 복원은 토양의 생물학적 복원 방법을 말한다. 자연적인 생물학적 분해, 분산, 회석, 흡착, 휘발과 화학, 생화학적 고정화를 통해 독성, 유동성, 양을 인간과 생태계에 악 영향을 주지 않는 범위까지 줄이는 방법으로 정의된다. 만약에 자연적 토양처리법이 선택되면, 오염물질의 분해와 감소를 보증하는 점검(monitoring) 과정을 필요로 한다. 생분해는 미생물이 토양이나 지하수에서 존재하는 유기오염물질을 분해시키는 과정이다. 산소가 충분히 공급되면, 미생물은 유기오염물질을 이산화탄소, 물, 그리고 미생물 세포 등으로 변화시킨다. 산소가 없는 상태에서 유기오염물질은 메탄, 이산화탄소, 수소등으로 변화된다. 때때로 오염물질은 초기 오염물질보다 독성이 증가된 중간생성물질로 변하기도 한다. 예를 들면 trichloroethylene(TCE)는 혐기성상태에서 분해되어 지속성과 독성이 강한 vinyl chloride(VC)가 된다. 오염토양의 지중 생분해 공정은 오염되지 않은 물에 산소와 양분을 섞어 토양에 주입함으로써 이루어진다. 때때로 특정미생물이나 산소 발생원인 과산화수소가 주입되기도 한다. 토양 내부에서 오염물질의 분포위치가 깊지 않은 경우는 주입관이나 살포장치를 이용하지만 오염물질 분해공정의 산화·환원력은 오염물질의 생분해에 많은 영향을 미친다. 따라서 in-situ 생분해는 오염물질에 따라 호기성 혹은 혐기성 상태를 유지시켜주어야 한다. 생분해는 저농도로 광범위하게 오염된 토양의 정화에 효과적이다. 생분해기법은 무기물질 자체를 분해 할 수는 없지만, 평형상태를 변화시켜 흡착, 응집, 농축시킬 수 있다. 이러한 기술은 광범위하게 연구중인데, 토양으로부터 무기물질을 제거하여 안정화시키는데 효과가 높다. 생물학적 통풍(Bioventing)은 토양에 존재하는 미생물에 산소를 공급함으로써 토양에 함유된 유류 탄화수소의 생분해를 활성화시

키는 기술이다. 토양증기추출법과는 달리 생물학적 통풍은 미생물의 활동을 유지시키기 위한 최소한의 산소를 주입한다. 산소는 직접공기주입을 통해 오염물질에 주입된다. 흡착된 유류잔유물의 분해와 휘발성 유기물질은 증기가 생물학적으로 활성화된 토양에 천천히 유입됨에 따라 생물학적으로 분해된다. 이 기법은 현재 실험 단계 이나 매우 경제적인 방법으로서 오염토양을 안정화시키거나 무기물 제거가 가능한 것으로 알려져 있다.

1. 생물학적 분해도 관련 인자

유류오염된 토양의 처리를 위해서는 주요 환경인자를 조절함으로써 그 효율을 극대화할 수 있는데, 주요환경인자로 토양수분량, pH, 온도, 산소함량, C:N:P 비, 미생물 밀도 및 활동성, 토양입자의 크기 분포, 유기물함유량, 양이온치환능력(Cation Exchange Capacity)등을 들 수 있다.

1-1 토양수분량

자연상태의 토양은 25% 정도의 물을 함유하고 있으나, 원활한 미생물의 성장을 위해서는 30-90% 정도의 물이 요구된다. 따라서 생물학적 처리방법인 landfarming 또는 bioventing의 경우 물을 첨가해 주어야 한다. Bioreactor의 경우 후처리에서 토양으로부터 물을 제거하는데 필요한 비용을 줄이기 위해 물의 양을 줄여야 하므로 적은 양의 물을 사용하는 공정의 개발이 필요하다.

1-2 pH

토양시료로부터 pH를 측정하기 위해서는 물을 첨가하게 되는데, 그 양은 1:1, 1:5 또는 1:10등 국가마다 다르게 적용하고 있다. 또한 기존에 존재하는 미생물의 원활한 성장을 위해서는 pH범위가 6~8이어야 하는데, 사상균의 경우는 오히려 pH 4가 최적인 것으로 알려져 있다. pH가 적절하지 못한 토양의 처리를 위해서는 이를 조절할 필요가 있는데, 이때 pH의 급격한 방지를 위해 완충용액(buffer solution)을 사용해야 한다.

1-3 온도

온도의 경우는 특히 오염된 토양을 있는 그대로 처리하는 방법(*in-situ*)에 있어 중요한 역할을 하는데, 약 10°C 감소함에 따라 미생물 반응속도가 2배 감소하는 것으로 알려져 있다. 그러나, 외부에서 처리하는 반응기인 bioreactor의 경우 직접 제어 가능하기 때문에 현장의 온도는 그다지 중요하지 않게 된다.

1-4 산소함량

산소는 물에 대한 용해도가 매우 낮으므로 (8 ppm at 25°C), 용존산소량이 중요하다. 그러나, 토양이 함유된 경우 air bubble의 분산에 의한 표면적 증가 및 air trap효과로 순수한 물에서보다 유리하다.

1-5 C:N:P 비율

미생물의 성장을 위해서는 영양분의 공급이 충분해야 하는데, 탄소원은 오염물질에서 얻을 수 있으나, 질소나 인은 토양내 함유량이 낮은 경우를 흔히 접하게 된다. 특히 미생물이 섭취하기 용이한 형태는 질소의 경우 ammonia, nitrate이고, 인의 경우 orthophosphate인데, 실제 토양내에서는 다양한 형태로 존재하여 미생물의 성장에 도움이 되지 않기도 한다. 뿐만 아니라, 이러한 형태로 존재하더라도 토양입자에 강하게 흡착되어 미생물이 쉽게 이용할 수 없는 경우도 흔히 나타난다. 실제 보고에 의하면, 흡착하여 무용하게 된 ammonia가 10-60%에 이른다고 한다. 따라서, 이들 N, P의 분석에 있어 원소분석치를 따르게 되면 실제 미생물이 필요로 하는 양보다 적은 양을 첨가하게 되는 것이다. 따라서 pH와 마찬가지로 물과의 혼합물로부터 실제 ammonia, nitrate, orthophosphate의 함량을 분석하는 것이 바람직하다. 이들 N, P 이외에도 S, Mg, Fe, Ca, K, Na, Mn 등의 무기물질과 비타민, 그리고, 아미노산 등 공유기질의 첨가가 처리효율을 증가시킬 수 있을 것이다.

1-6 미생물량 및 활동성(population dynamics)

토양내 미생물의 수는 plate count technique을 이용한 CFU의 측정, MPN(Most Probable Numer)법, acridine orange나 DAPI등의 형광염료로 착색한 후 현미경으로 관찰하는 법, 효소반응을 이용한 ATP측정등을 사용하여 측정할 수 있다. 그 중에서 가장 간단하면서도 미생물의 형태를 직접 확인할 수 있는 다양한 배지를 이용한 CFUs측정이 가장 많이 사용되는 방법이다. 또한 미생물활동성 측정방법에는 현재 선진국에서 활용하고 있는 이미 기존의 오염토양에 존재하고 있는 미생물의 DNA의 추출/조작을 통한 처리가능성을 진단하는 방법(DNA Probe, 16sRNA) 혹은 호흡률(Respirometer)를 이용하는 방법 등을 들 수 있다.

1-7 토양입자의 크기분포

토양입자의 크기분포도는 특히 공극률과 관련되어 gas exchange 측면에서 해석하게 된다. 즉 모래, 자갈, 바위같은 큰 입자의 경우에는 공극률이 증가하여 gas exchange가 용이하게 된다. 그러나, 이러한 관점은 in-situ process에서 중요한 역

할을 하게 되며 반응기를 응용할 경우에는 감시방법등이 오염물질의 농도에 큰 영향을 미친다. 액상의 경우 토양입자의 원활한 혼합을 위해서는 큰 입자는 배제되어야 할 것이다. 또한 반응기의 경우에 있어서도 혼합 및 응집현상에 중요한 역할을 할 것이다. 입자의 크기에 따라 오염물질의 분포가 많은 차이를 보이는데, 실트/점토 부분에 PAH의 90%가 흡착되어 있다는 사실이 보고되고 있다. 따라서, 입자의 크기에 따라 다른 처리 공정을 적용하는 것도 중요한 의미를 가진다.

1-8 유기물함량

유기물질을 이루는 것으로는 식물, 동물의 사체, 또는 이들의 변환물질등이며 오랜 시간에 걸쳐 안정화되어 토양에 강하게 흡착되어 있다. 분해가 용이한 탄수화물, 지방, 단백질등은 nonhumic substances라고 하며, 리그닌과 같이 분해가 용이하지 않은 물질을 humic substances라고 한다. 이러한 유기물질은 오염물질의 흡착뿐만 아니라 oxygen sink로서도 작용하게 된다. 이를 측정하는 방법으로는 TC(Total Carbon)와 IC(Inorganic Carbon)의 차이인 TOC(Total Organic Carbon)로부터 구할 수 있는데 간단하게는 105°C에는 존재하고 있으나, 600°C에서 휘발되는 물질의 함량을 측정함으로써 구할 수 있다.

1-9 양이온치환능력(Cation Exchange Capacity)

토양의 기본 입자로서 미네랄표면은 음전하를 띠고 있어 양이온의 교환이 일어나게 된다. 이의 척도로서 CEC(Cation Exchange Capacity)를 사용하는데, 흔히 meq/100g soil 또는 cmol/kg soil 단위를 사용한다. CEC가 클수록 양전하를 띠는 오염물질의 흡착을 증가시킨다. 이 값은 특히 중금속 처리에 있어 중요한 역할을 하게 된다. 한편 측정은 대표적인 양이온(암모니아 등)을 토양에 첨가해 흡착하지 않은 양을 측정함으로써 구할 수 있다.

2. 생물지구화학 (Biogeochemistry)

각종 생물들이 지구화학에 미치는 영향을 생물지구화학이라 한다. 생물지구화학은 생물학적으로 중요한 물질들 (탄소, 질소, 인, 황 등)과 미량의 물질들의 지구 순환에 관여한다. 생물지구화학은 pH, 온도, 이온력, 염도, 자외선의 영향을 받는다.

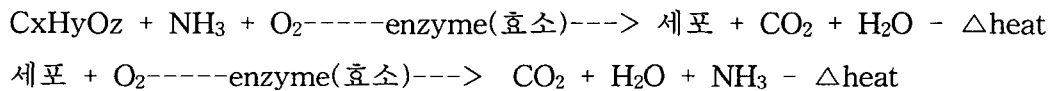
생물지구화학적 공정은:

- 독성 유기물의 이동과 분해에 관여한다.
- 유해한 금속물질의 산화/환원작용에 관여하여 이동에 영향을 미친다.
- 유해한 비금속 물질의 이동과 분해에 관여한다.

더 많은 에너지가 미생물의 호기성 호흡으로 이루어지기 때문에 산소가 존재한다면, 산소가 전자 수용체 (Electron acceptor)로서 주 역할을 수행하게 된다. 산소가 다 소모되면 NO (Nitrate oxygen) 등 주위에 있는 다른 형태의 산소를 이용하기 시작한다. 철과 망간에 산화된 형태의 산소도, 황산염 환원 이전(Sulfate reduction)에 미생물의 신진대사에 전자수용체로서 역할을 수행할 수 있다. 철이온 (Ferric ion) 자체는 방향족 탄화수소의 분해에 전자수용체 역할을 수행하기도 하나, 망간이온은 전자수용체 역할을 하지 못한다. 철이온, 망간이온은 황산염 환원 도중에 같이 용해된다. 환원된 형태의 철과 망간이 산소를 완전히 소진한 다음에는 혐기성 미생물들, 황산 환원 미생물, 메탄화균 (Methanogens)이 출현한다.

생물지구화학 과정/공정은 영양분의 사용가능성과 순환에 영양을 주는 데 특히 영양분은 생물학적 분해에 아주 중요하다. 영양분의 추가량은 전자수용체가 공급되는 동안 분해되어야 하는 탄소의 양을 계산하여 알아낼 수 가 있다. 이 값을 기준으로 생물학적 물질의 탄소 : 질소 : 인의 비를 이용하여 필요한 질소와 인의 양도 알아 낼 수 있다.

유기 물질이 자연 토양에 접촉하면, 수용성 유기물질의 일부분은 미생물에 의해 흡착되거나 저장되어 의해 제거된다. 추가 수용 유기물은 산화작용을 통해 제거되는데, 체내의 발열성 호흡을 통해서 미생물의 생성, 이산화탄소와 물의 생산이 이루어지고 이는 다음의 반응식으로 표현된다.



모든 세포 합성은 발열 반응으로 에너지는 반응열로 공급된다. 이들의 정량적인 관계는 실험을 통해서만 정확하게 확인이 가능하다. 그러나 유기물질의 운명은 생물학적 분해의 기작에 관한 정보로 예상이 가능하다.

미생물의 성장과 기질의 제거(섭취) 관하여 제시된 많은 모델 중, 모노드 (Monod relation) 관계가 가장 많이 사용된다. 세포의 성장 속도는 biomass와 1차 (first order) 관계이고 기질의 농도와는 혼합지수(mixed order)의 관계이다. 모노드 관계와 기질 제거의 선형 관계를 이용하여 미생물의 성장 형태를 표현 할 수 있다. 즉, 순성장속도(net growth rate)를 μ_{net} 라고 하면

$$\mu_{net} = \text{성장} - \text{소멸} = Yk_s/K_s + S - b$$

$Y = \text{생산량}(M_x/M_s)$ M_x : biomass, M_s : 기질(substrate)

$k_s = \text{최대 기질 이용속도}(M_x M_s/t)$

$S = \text{기질 농도}(M/L_3)$

$K_s = \text{포화 계수}(M/L_3)$

$b = \text{specific biomass 소멸 계수}(1/t)$

실험재료 및 방법

1. 토양의 물리적 특성 및 균주수/동정

토양의 물리적 특성으로 pH, 함수율을 측정하였다. pH는 토양에 증류수를 1:2(w/v)의 비율로 첨가하여 10분 이상 섞은 후 10분 이상 정치시켜서 토양 입자를 가라앉힌 다음 pH미터로 측정하였다. 토양의 함수율은 일정량의 토양을 105℃에서 24시간 건조한 후, 건조 전후의 질량을 측정하여 계산하였다. 실험에 사용된 토양 시료는 유류오염 지역 표층과 2m 깊이의 토양을 코어 샘플러(Geoprobe)를 사용하여 채집하였으며, 채집된 토양 시료는 1.7mm 채로 거른 후 실험에 사용하였다. 통기에 의한 미생물학적 요인의 영향은 각각 토양 시료를 Erlenmeyer 플라스크에 일정량씩 분주하여 넣은 후, 전혀 통기하지 않은 조건과 항시 통기, 2일 간격 통기, 일주일 간격으로 통기한 조건으로 유지하면서 시료를 채취하여 실험하였다.

2. 미생물균주 수

총세균수(TBC)는 DAPI로 염색하여 형광현미경(Fluorescence microscope, Axioscop, Zeiss)와 image analyzer를 사용하여 1,600배의 배율에서 계수하였으며 (Fig 7), 종속영양세균수(HBC)는 영양염 한천배지(Nutrient Agar Media)에 배양하여 계수하였다. 유류분해세균의 수(PDB)는 유일한 탄소원으로 등유(Kerosene)와 경유(Diesel)를 각각 공급한 후 96-well microtiter plates를 사용하여 MPN법으로 계수하였다.

3. 세균의 분리 및 동정

등유와 경유를 유일한 탄소원으로 사용한 농화배양을 통해 유류분해세균을 분리하였으며, 지방산(fatty acid)을 추출하여 GC로 분석하고 미생물 검증시스템(Microbiological Identification System)으로 동정하였다.

4. 토양 미생물의 ETS 활성도

미생물의 활성도는 INT를 사용하여 전자전달계의 활성도를 측정하여 구하였다. 박테리아의 활성도만을 측정하는 시료는 사상균의 활성을 억제하는 cycloheximide 용액(16mg/ml)을 0.2ml 첨가하였다. INT를 첨가하여 25℃, 빛을 배제한 곳에서 24시간 배양한 후 메탄올을 넣어 INT-formazan을 추출한 다음 흡광광도계(Cary 3E, Varian)로 480nm에서 흡광도를 측정하여 ETS 활성도를 측정하였다. Cycloheximide를 첨가하지 않은 시료를 총미생물활성도로, 항생제를 첨가한 시료를 박테리아의 활성도로, 이 두 활성도의 차이를 사상균의 활성도(Fig. 4)로 계산하였다.

5. Selective plating 혹은 Enrichment 기술

유기물을 산화시킬 수 있는 종속영양세균계수(Heterotrophic bacterial count)를 하기 위해 준비한 배지로서 NAM(Nutrient Agar Medium)를 이용(15g agar and 8g of Nutrient broth per liter of distilled water), 유류오염물질을 산화시킬 수 있는 미생물을 배양하여, 그 결과는 Table 3.1에 나타내었고, 배지상에 나타난 세균수는 Fig. 6에 나타내었다.

6. Microcosm study

이 실험에서는 표층시료와 2m 깊이 시료를 가지고 공기주입기간에 따른 미생물 분포 및 활성효과에 대해서 고찰하였다.

고 찰

1. 물리적 특성

표층시료와 2m 깊이 시료의 pH는 각각 7.10과 7.16으로 측정되었으며, 함수율은 각각 15.28%와 6.86%였다.

2. 통기조건이 미생물 분포에 미치는 영향

종속영양세균은 표층 및 2m 깊이 시료의 경우 항시통기 조건에서 시간이 경과함에 따라 증가하는 경향을 나타내었으며, 다른 aeration 조건에서는 거의 차이가 없거나 감소하는 경향이 관찰되었다 (Fig. 2, 3).

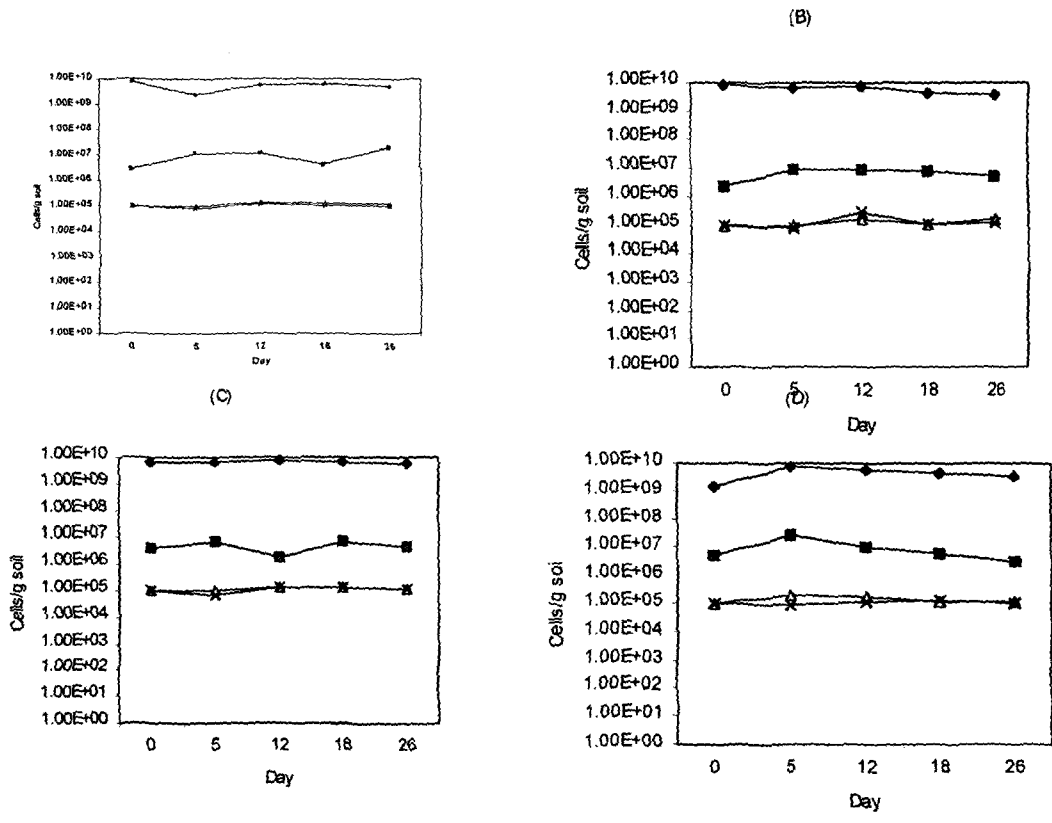
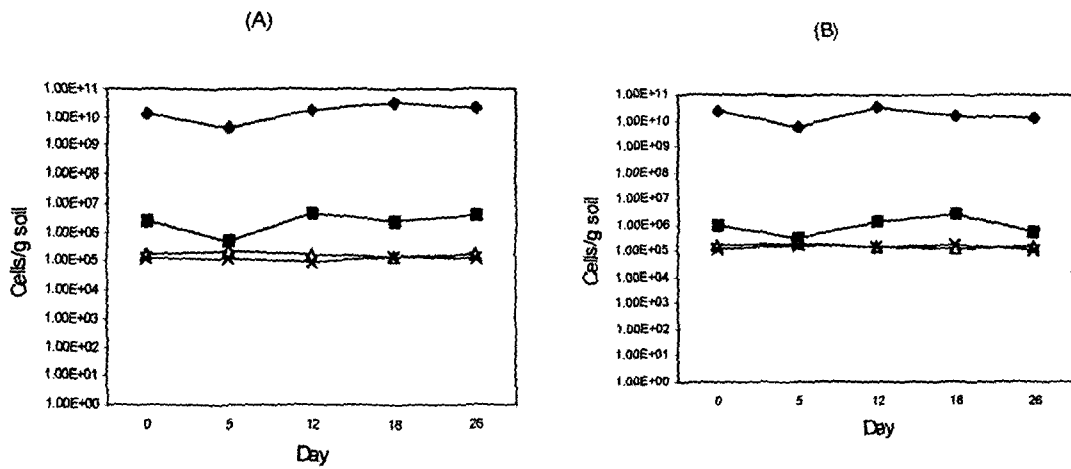


Fig. 2. Aeration effect on microbial distribution in 2m-depth soils.
 (A) Frequently aeration (B) Daily aeration (C) Weekly aeration (D) Non-aeration



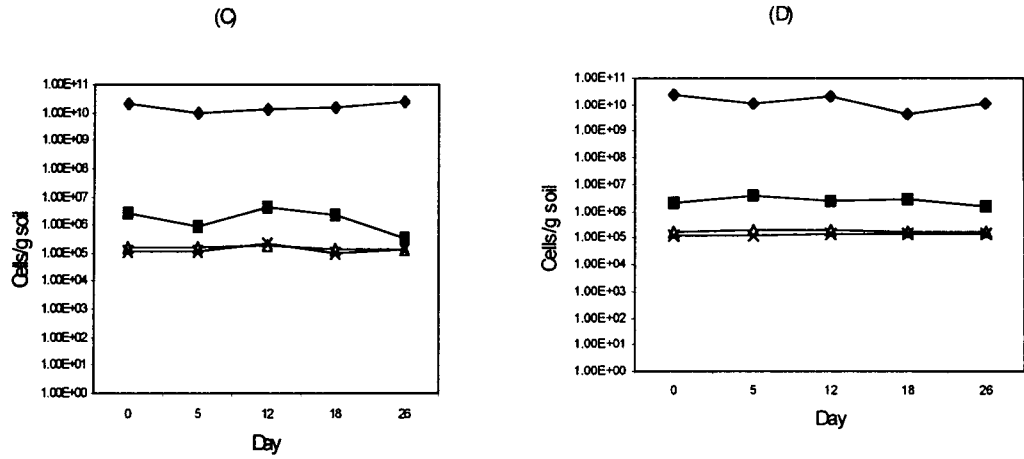


Fig. 3. Aeration effect on microbial distribution in surface soil
 (A) Frequently aeration (B) Daily aeration (C) Weekly aeration
 (D) Non-aeration

3. 미생물 활성도의 변화

2m 깊이 시료를 항시통기 조건으로 실험하였을 때 시간이 경과함에 따라 모든 미생물 활성도가 증가하였다 (Fig. 4).

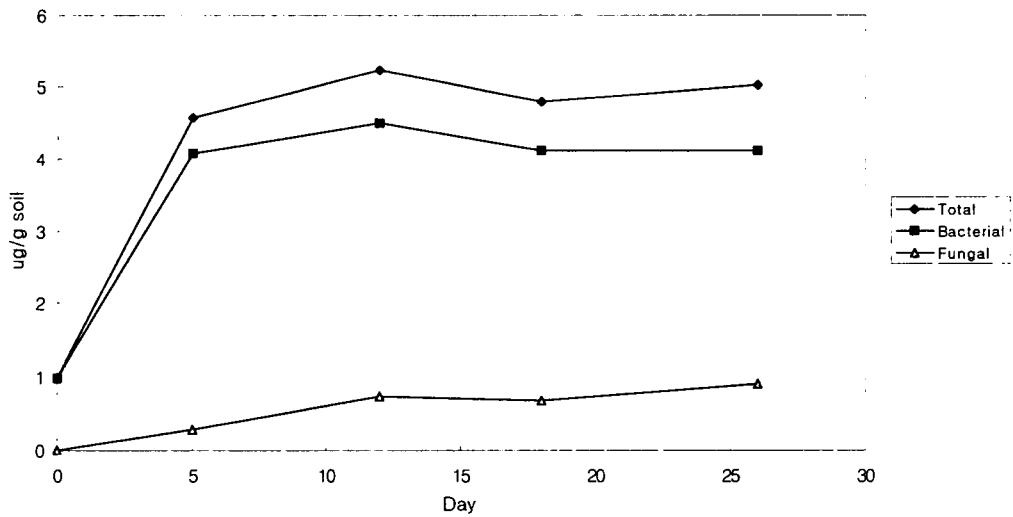


Fig. 4. Frequently aeration effect on ETS activity in 2m-depth soil.

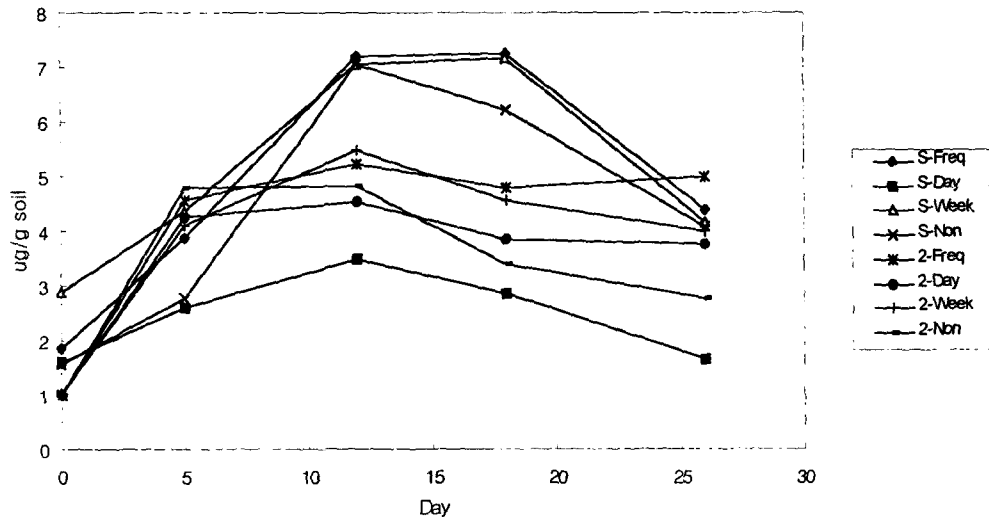


Fig.5. Aeration effects on total ETS activity in surface and 2m-depth soils.

반면에 다른 통기 조건과 표층 시료의 경우는 초기에 ETS 활성도가 증가하였으나 시간이 경과함에 따라 활성도가 급격히 감소하는 것이 관찰되어(Fig. 5) 통기조건이 미생물 활성도에 지속적인 영향을 나타내지 못하는 것으로 확인되었고, 그 이유로 수분함량에 의한 영향인 것으로 판단된다. 항시 aeration시 토양시료의 수분 손실이 지속적으로 일어나, 본 실험 종료 후 측정된 함수율에서 거의 0%로 조사되었다.

4. 유류분해세균의 분리

본 실험결과에 의하면 미생물의 활성도는 aeration 효과에 의해 증진될 수 있으나 통기조건에 경우는 aeration 효과와 더불어 토양시료의 수분감소로 인한 영향이 미생물 분포와 활성도에 더 큰 영향을 미치고 있음을 확인할 수 있었다. 또한, 등유와 경유를 유일한 탄소원으로 사용하였을때 표층과 2m 깊이 토양으로부터 *Burkholderia cepacia*와 *Burkholderia solanacerum* 두 종의 유류분해세균이 동정되었고, Fig. 6은 Nutrient Agar 배지를 이용하여 성장시킨 미생물 군집을 나타낸 것이다.

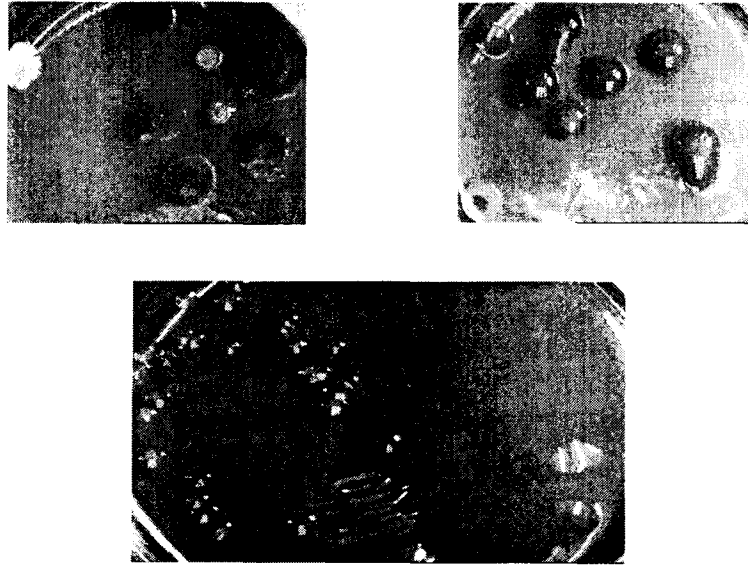
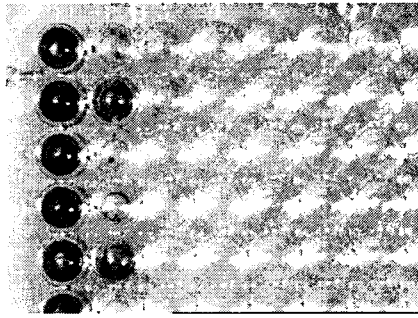


Fig. 6. The Nutrient Agar Culture for heterotrophic bacteria in HC contaminated soil.

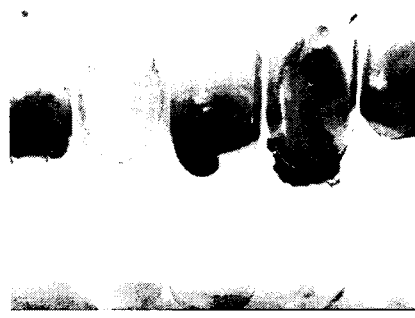
Fig. 7은 Total Bacteria를 DAPI staining한 후 Fluorescence microscope로 계수한 것이다. 본 실험에서는 희석배율을 높여 토양입자가 거의 완전히 제거된 상태에서 계수하였다. 따라서, 아래 사진은 임의로 낮은 희석 배율의 시료를 택하여 촬영한 것이고 Fig.에서의 흰 부분이 활성화된 미생물의 농도를 나타내는 것이다.



Fig 7. The active bacteria in HC contaminated soil using DAPI (Fluorescence microscopy, X 1,600)



Microtiter plate를 사용한 MPN



Test tube를 사용한 MPN

유류분해 세균이 존재하는 tube에서는 INT첨가시 화학반응으로 인해 붉게 변한 것을 볼 수 있다. 유류분해 세균은 oil과 media의 계면에서 성장하기 때문에 위의 사진에서 oil층이 붉게 나타나 있다. 따라서, 본 실험에서는 MPN 방법을 사용하고, INT 반응을 이용하여 유류분해 세균을 계수하였다.

Table 3.1 The basic result for microbial activity

분석 항목		결과
Moisture content		5.7%
pH _{v.12}		7.70
Total bacteria		1.20×10^4 Cells/g
Heterotrophic bacteria		5.30×10^5 CFU's/g
Petroleum - degrading bacteria	Kerosene	1.68×10^2 Cells/g
	Diesel	1.84×10^2 Cells/g
TPH(Total Petroleum Hydrocarbons)		ND
Heavy metal	Al	140.5 ppm
	Ba	1.0 ppm
	Ca	5.7 ppm
	Cr	0.2 ppm
	Fe	91.2 ppm
	Mg	19.5 ppm
	Mn	2.1 ppm
	Si	Major
	Ti	Major
	V	0.1 ppm
	Zn	0.2 ppm
	Cd	
	Cu	
As		

결 론

본 연구결과에 의하면 미생물의 활성도는 aeration 효과에 의해 증진될 수 있으나 통기조건에 경우는 aeration 효과와 더불어 토양시료의 수분감소로 인한 영향이 미생물 분포와 활성도에 더 큰 영향을 미치고 있음을 확인할 수 있었다. 결과적으로 본 실험에서는 aeration 만을 하나의 factor로 결과를 평가할 수 없으며, 따라서 시간 경과에 따른 시료의 함수율이 결과 해석에 중요한 영향을 미치고 있음을 확인할 수 있었다.

ETS 시스템을 이용한 미생물활성도 측정에서는 2m지점 토양의 활성도와 표층토양의 활성도가 거의 유사하게 나타났고, 이것은 통기를 통해 2m지점에서의 유류산화미생물의 분포도를 증가시키는 결과를 가져온 것으로 보여진다.

등유와 경유를 유일한 탄소원으로 사용하였을 때 표층과 2m 깊이 토양으로부터 *Burkholderia cepacia*와 *Burkholderia solanacearum* 두 종의 유류분해세균이 분리 동정되었다.

참 고 문 헌

- Kim, Moo-Hoon et. al., " The Use of DPT methodologies for the site characterization in Korea ", Proceedings of 4th International Symposium on Environmental Geotechnology and Global Sustainable Development, Boston, Massachusetts, U.S.A. (accepted) (1999)
- Kim, Moo-Hoon and L.C Clesceri., " The assessment of the bioremediation potential on MGP soils ", Journal of the Environmentally Conscious Design and Manufacturing, New Mexico, U.S.A. vol 8(2):35-42 (1999)
- 김 무 훈, 이 원 권, 박 대 원., 국내 토양오염 유발시설별 오염현황조사 "○○매립지 오염현황조사", 한국폐기물학회지, 15(4):889-894 (1998)
- 김 무 훈, 곽 무 영., 국내 토양오염 유발시설별 오염현황조사 " XX인근 주유소 오염현황조사", 한국토양환경학회지, 3(1):49-57 (1998)
- 김 무 훈., 국내 토양오염 유발시설별 오염현황조사 " ○○인근 주유소 오염현황조사 ", 한국토양환경학회지, 2(3):9-24 (1997)

Kim. M.H.,: " Bioremediation and Biotechnology " J. of Technology Innovation,
8(2):64-71 (1995)

Mattney Cole., " Assessment and Remediation of Petroleum Contaminated Sites",
Lewis Publishers (1994)

EPA., " Subsurface Characterization and Monitoring Techniques": Volume I(1993)